

纯化眼镜蛇类毒素的稳定性的研究

Y. KAWAMURA 和 Y. SAWAI

(日本蛇类研究所)

已有一些科学工作者对眼镜蛇毒类毒素的纯化、失活和免疫进行了广泛的研究 (Sawai 等, 1973; Fukuyama, 1974; Fukuyama 和 Sawai, 1974)。还有报道说,眼镜蛇毒类毒素,在 37°C 条件下保存 20 天后,给鼠腹腔注射,能致死;而保存在 4°C 或保存在 37°C 冻干的类毒素则无毒性 (Fukuyama 和 Sawai, 1975; Sawai 和 Fukuyama, 1978)。本文是有关台湾眼镜蛇毒类毒素的纯化、稳定性及其免疫原性的研究。

材料和方法

台湾眼镜蛇 (*Naja Naja atra*) 毒液由日本蛇类研究所提供。用乙醇分级分离蛇毒的操作步骤如下:把百分之二(20mg/ml)的原毒液(粗提毒液)溶于 mol/L/60 的磷酸盐缓冲液中 (PBS), pH 7.0, 温度保持在 5°C, 逐渐加入浓度为 20% 的纯乙醇,然后将其保持在一 5°C, 经过 30 分钟,再放入冷冻离心机中,每分钟 8,000 转,离心 15 分钟。所得沉淀物溶于磷酸盐缓冲液中,保存在 2°C (F₁)。上清液进一步加入纯乙醇,使浓度增到 70%。溶液于一 20°C 保持 2 小时后离心,使沉淀物从上清液中分出 (F₂),溶于磷酸盐缓冲液中 (F₂)。分离出的各部分用自来水反复透析除去乙醇后,冻干。

致死毒性检测,将 0.2 ml 连续稀释的原毒液或冻干的分离物腹腔注射到 20g 重的 5 只鼠内,注射 24 小时后,用 Litchfield 和 Wilcoxon 的方法计算这些溶液的 LD₅₀ 剂量。

免疫扩散试验,是用 Ouchterlony 的双向扩散法研究原毒液和各部分毒液之间的关系 (ouchterlony, 1948)。

用福尔马林去毒及类毒素的稳定性试验,按如下步骤进行。在不同数量的经提纯的 F₂ 部分和含量范围为 0.25 至 4 mg 的原毒液溶液内,加入不同浓度的福尔马林,从 0.5—6%,划分为二个或四个不同剂量,间隔一周,温度 37°C。每次加了福尔马林后,将溶液 pH 调整到 7.0。首次加福尔马林四周后,各溶液用自来水反复透析以去除福尔马林,并检测其毒性,即将 0.5ml 溶液经 37°C 保温 20 天或将未经温育的溶液腹腔注射到 5 只鼠内。

眼镜蛇类毒素的纯化制剂 (F₂) 及原毒液的处理按下列操作步骤进行。将百分之二 (20 mg/ml) 的 F₂ 分离物或原毒液溶于 mol/L/60 PBS 中, pH 7.0, 将 5.25% 的福尔马林分为 8 个剂量加入,共 7 周,间隔一周一次,温度 37°C。最后一次加入福尔马林后一周,检查这些类毒素的去毒情况,然后用自来水反复透析 4 小时,再用 mol/L/60 醋酸缓冲液 (pH 6.0), 温度 5°C F, 透析 4 天,以去除福尔马林。类毒素的蛋白质含量用光度测定法,调节到 2mg/ml, 并经过微孔滤器除菌。将相同数量的氢氧化铝 (2.5mg/ml), 作为佐剂加进类毒素,并加 0.01% 香料 (thymerosal) 作为防腐剂。

类毒素的免疫原性试验是把 0.5 ml 的每(部分)份毒素皮下注入重量为 400g 的雌性豚鼠,间隔四周,在最后一次注射后两周,从被免疫豚鼠中,取血测定。

同时利用体重为 3.0 kg 的兔子进行类毒素皮下注射, 1.0 ml 和 1.5 ml 的各 2 剂, 间隔时间同上述,在第三次及第四次注射后两周,从这些动物抽出部分血液测定(从受试动物体内采取血液样本)。

从血液中分离出来的血清被用作抗毒素水平测定。将 0.2ml 的各血清与 0.1ml 不同浓度的类毒液溶液相混合, 温度 37°C, 保温一小时, 然后皮下注入 5 只鼠内。24 小时后, 从存活下来的鼠的数目计算类毒液被血清中和的最大值。结果与对照鼠的相比较, 并计算被血清中和的最小致死量值。

另一方面, 被免疫的动物在采血后一周于肌肉注射 0.1 ml 含量不同的类毒液, 其范围从 0.3 至 6 mg, 检测其抗毒作用并与非免疫对照组相比较。

结 果

(一) 用乙醇沉淀的分离物的毒性 在表 1 中可以看出, 以每 μg 干重的 LD_{50} 剂量所代表的 F_2 的相对毒性增至原毒液的 2.3 倍。

表 1 用乙醇沉淀的眼镜蛇毒液的分级分离

	致死量 50(μg)	干重 (mg)	毒性 (致死量 50/ μg)
原毒液	11.5	2,000	0.087(1.0)
F2	5.0	550	0.20(2.3)
F3	17.0	865	0.06(0.7)
F1	18.6	44	0.05(0.6)

注: 圆括号内的数字表示与原毒液相比较的毒性。

(二) 原毒液和分离毒液之间的免疫关系

正如图 1 所示, 抗毒素与原毒液 F_1 和 F_2 之间的沉淀(素)线已融合在一起, 只在原毒液与 F_3 之间出现沉淀线。结果表明原毒液、 F_1 和

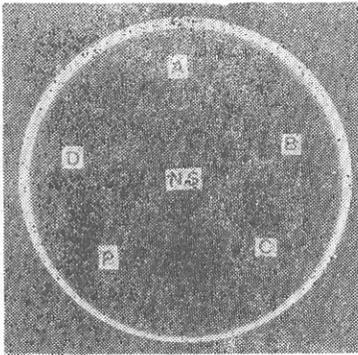


图 1 乌克特罗尼反应

周围孔中的毒素 (A) 是 F_1 , (B) F_2 , (C) F_3 , (D) 是原毒液。(P) 是磷酸盐冲剂。中心孔中的抗毒素 (N·S) 是抗眼镜蛇毒的

表 2 是用眼镜蛇毒类毒素免疫的豚鼠抗毒液的中和结果及对毒素的抵抗作用

豚 鼠	最小致死量 ($\mu\text{g}/0.2\text{ml}$)	注射毒液 (mg)	存活
15	1.5	0.3	S
12	1.5	0.3	S
3	1.5	0.3	S
14	1.5	0.3	S
2	2.1	0.6	S
A10	1.5	0.6	S
16	1.5	0.6	S
5	1.2	0.6	D
9	2.1	1.2	S
4	2.0	1.2	S
7	2.0	1.2	S
1	1.2	1.2	D
30	1.2	0.3	S
19	1.2	0.3	S
20	1.1	0.3	D
21	1.1	0.3	D
25	1.2	0.6	D
B27	1.2	0.6	D
26	1.1	0.6	D
29	1.1	0.6	D
23	—	1.2	D
28	—	1.2	D
31	—	1.2	D
32	—	1.2	D

A: 用 3 剂量的 F_2 类毒素免疫。B: 用原毒液类毒素免疫。S: 存活。D: 在 24 小时内致死。原毒液最小致死量是 0.3 mg。

F_2 之间在抗原性质方面是密切相关的。

(三) 福尔马林去毒浓度与 F_2 类毒素的稳定性之间的关系 实验中发现, 在含有 0.5 mg/0.25 ml (0.2%) 至 2 mg/0.5 ml (0.4%) 类毒素的溶液中, 添加福尔马林的浓度达 0.5—6% 时能使其失活。但是象表 2 中所看到的那样, 在 37°C 条件下, 温育 20 天后, 类毒素的毒性发生一定的回复。然而, 如果增加福尔马林的浓度就可以防止毒性回复。这样, 如果福尔马林的浓度增到 6%, 含有 F_2 分离物的 4mg/0.5ml 的类毒素, 不能杀死鼠。因此, 可以看到类毒素的稳定性随着福尔马林浓度的增加而增强。

(四) 类毒素的免疫原性 从免疫豚鼠得到的 0.2 ml 血清与 0.1 ml 的毒液相混合, 毒素含量范围为 15.02 至 38.97 μg , 温度 37°C, 温育一小时, 然后将 0.3 ml 的混合液分别给 4 只

表 3 用取蜈蚣毒素免疫的抗毒液中和结果及其抗毒作用

兔	最小致死量 (μg) 0.2 ml (1, 2, 3)	注射毒液 (mg)	存活
2	1.5, 1.8	2	S
5	1.6, 1.8, 1.2	2	S
A7	1.4, 1.8	4	S
1	1.4, 2.1, 1.1	4	S
3	2.4, 2.6, 1.0	6	S
8	1.5, 1.8, 1.3	6	S
15	1.1, 1.5	2	S
14	1.2, 1.4, 1.0	2	S
10	1.0, 1.1	3	D
B12	1.4, 1.4	3	D
9	1.0, 1.5	4	D
13	1.0, 1.2	4	D

A: 用 F_2 类毒素免疫。B: 原毒液类毒素免疫。最小致死量由 0.2 ml 抗毒液中和。1, 2, 3: 1 和 2 表示分别给兔 3 和 4 剂量类毒素后, 从兔抽取血清的抗毒液水平。3 表示 6 个月后的抗毒液水平。S: 存活, D24 小时致死。1 mg 是在兔中的最小致死量。

鼠皮下注射。对照组, 配制浓度范围在 11.29 至 18.18 μg 的毒液 0.1 ml 给鼠注射, 方法同上。

注射 24 小时后, 抗毒液的抗致死量与毒液 (15.02 μg) 的最小致死量的复合量一样计算。从表 2 可以看出, 用 F_2 类毒素免疫血清的抗毒素水平范围为 1.21 至 2.14 μg , 而用原毒液类毒素免疫的却是 1.1 到 1.21 μg 。

抽血一周后, 给这些豚鼠肌肉注射不同量的原毒液, 范围为 0.3 至 1.2 mg, 并观察抵抗毒素的效果 48 小时。从表 2 中可以看出, 大多数用 F_2 类毒素免疫的豚鼠能够抵抗 1—4 个 MLDs 的毒素的毒性而存活下来。而用原毒液类毒素免疫的豚鼠则只能抵抗 1 或 2 个最小致死量的毒素的毒性。

另一方面, 在表 3 中可以看出被免疫兔的血清抗类毒素的水平, 当兔用 3 或 4 剂量的 F_2 类毒素免疫后, 其可由 0.2 ml 抗毒液中和的最小致死量分别变动于 1.4—2.4 μg 和 1.8—2.6 μg 范围之间, 而那些用原毒液类毒素免疫的

兔, 其类毒素相应数值范围却分别为 1.0 至 1.4 μg 和 1.1—1.5 μg 。6 个月后抗毒液的水平减少到 1.0 或 1.3 μg 。

在保护作用试验中, 一些兔肌肉注射不同数量的原毒液, 范围在 2 mg (2 最小致死量) 到 6 mg, 如表 3 所示, 用 F_2 类毒素免疫的兔全部存活, 而用原毒液类毒素免疫的那些兔中, 只有 2 只能够抵抗 2 mg 原毒液的毒性而存活。

表 3 概括了鼠和兔血液中抗毒素水平的高低和对抗原毒液毒性大小之间的关系。从表中可以看出, 其血液的中和剂量超过 1.5 最小致死量 (0.2 ml 抗毒素中和的毒素超过 1.5 最小致死量的豚鼠似乎能抵抗 1.3 或 1.2 mg (1—4 个最小致死量) 的毒素。而血液中抗毒素水平相同的兔子, 则能抵抗 (2—6 个最小致死量) 的毒性而存活下来。因此, 血液中抗致死抗毒素水平与可忍受的毒素量大小之间存在着一定的相互关系。

讨 论

据先前的报道 (sawai and Fukuyama yama, 1978) 不可能用诸如: 氨基酸、精氨酸、谷氨酸钠盐、丙氨酸、半胱氨酸来阻止类毒素的毒性的回复。但是, 由增加去毒用的福尔马林的浓度成功地防止了毒性的回复, 尽管由于类毒素的蛋白质含量不同, 福尔马林的最适浓度也不同。这样, 解除 0.5 ml 中含有 4 mg 类毒素的蛋白质的毒性, 防止其回复, 则需要 5 或 6% 的福尔马林。

还有报道说: 在硫酸铵盐解除原毒液或毒液分离成毒性的过程中出现了大量的沉淀物, 而加进 L-赖氨酸或 L-精氨酸可以防止沉淀。然而, 用乙醇处理过的 F_2 分级分离物并不出现沉淀。因此, F_2 类毒素不仅有上面所述的优点, 而且与原毒液的类毒素相比, 具有较好的稳定性和对实验动物的抗原性。

(商孝同译自 [The SNAKE, 1984 V(16), 27—32] 刘冬梅校)